



УДК 577.152.199.2'145

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЛЮЦИФЕРАЗА В КАЧЕСТВЕ БИОДЕТЕКТОРА
ФЕРОМОНОВ НАСЕКОМЫХ

Исмаилов А. Д., Козалев Б. Г. *, Сахаров Г. Н.,
Стрельский В. В., Данилов В. С., Егоров Н. С.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;

*Всесоюзный научно-исследовательский институт биологических методов
защиты растений, Кишинев

Изучены особенности функционирования бактериальной люциферазы в качестве биодетектора феромонов насекомых. Разработанная биолюминесцентная аналитическая система отличается высокой чувствительностью и быстродействием. Пороговая чувствительность к C_{16} -ненасыщенным альдегидам-феромонам достигает 10 пг для люциферазы из *V. harveyi* и 100 пг для люциферазы из *Vibrio fischeri* при времени анализа менее 1 мин. На биолюминесцентных характеристиках отражаются структурные параметры молекулы феромона: длина цепи, число, положение и изомерия двойных связей. В ряду насыщенных альдегидов наиболее активен тетрадеканаль, в ряду моноеновых и диеновых альдегидов наибольшей субстратной специфичностью обладают изомеры с 16 углеродными атомами. Проведен анализ феромонов в железах дубового шелкопряда *Autheraea pernyi*. Для анализа достаточно экстракта желез одной самки. Обсуждаются особенности взаимодействия стереоизомеров алифатических альдегидов с бактериальной люциферазой.

Бактериальная люцифераза является по своей природе монооксигеназой (КФ 1.14.14). Окисление алифатического альдегида ($RCHO$) молекулярным кислородом, катализируемое ферментом при участии восстановленного флавимоноуклеотида ($FMN \cdot H_2$), приводит к интенсивной люминесценции в сине-зеленой области спектра:



Таким образом, появляется уникальная возможность следить за реакцией окисления альдегида до кислоты по интенсивности свечения.

Фермент характеризуется высокой специфичностью в отношении структуры альдегидного субстрата. В биолюминесцентной реакции активны алифатические альдегиды с длиной цепи C_8-C_{18} [1-3]. Для насыщенных альдегидов показано, что интенсивность люминесценции и кинетические параметры реакции люцифераз из различных видов люминесцентных бактерий зависят от длины цепи альдегида. Средство люциферазы к насыщенным альдегидам растет с увеличением длины цепи в диапазоне C_8-C_{14} [2, 4]. По данным работ [4, 5] максимальная скорость реакции наблюдается при взаимодействии люциферазы с тетрадеканалем, по другим данным — с деканалем [6].

Сведения по взаимодействию ненасыщенных или замещенных альдегидов с люциферазой носят отрывочный и противоречивый характер. Признаны неэффективными в реакции с люциферазой из *Vibrio fischeri* соединения с α , β -ненасыщенными связями (2-деценаль) и с заместителями вблизи функционального конца альдегида (4-этилоктаналь), первый — вследствие изменения энергии резонанса карбонильной группы, второй — вследствие влияния стерического фактора на связывание альдегида с ферментом [7]. В ряде работ, опубликованных в последние годы [8, 9], реакция бактериальной люциферазы с ненасыщенными алифатическими альдегидами исследовалась с целью разработки метода биолюминесцентного анализа альдегидов-феромонов; сделан вывод о перспективности исследовавшей в этой области.

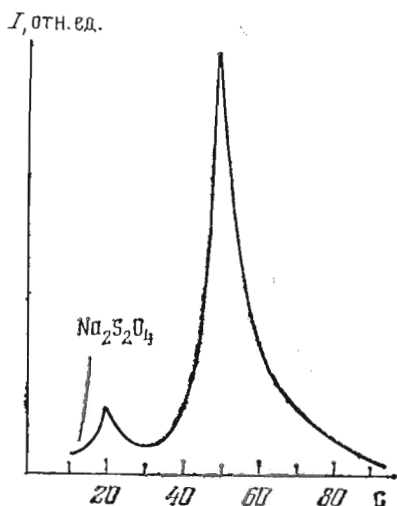


Рис. 1

Рис. 1. Динамика световой эмиссии бактериальной люциферазы *V. harveyi* в присутствии (E, Z)-6,11-гексадекадиенала

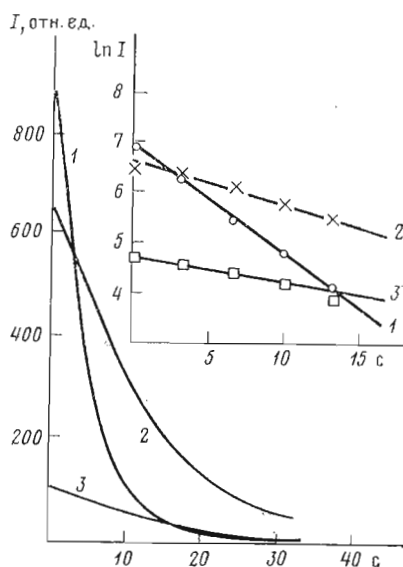


Рис. 2

Рис. 2. Кинетика распада возбужденного комплекса люциферазы из *V. fischeri* с (Z, Z)-6,11-гексадекадиеналем (1), (E, Z)-6,11-гексадекадиеналем (2) и (E, Z)-6,11-тетрадекадиеналем (3). Концентрация фермента 4 мкг белка/мл, концентрация альдегидов 0,6 мкг/мл

Свыше 20 видов насекомых — вредителей сельского хозяйства содержат в качестве основных и минорных компонентов половых феромонов различные стереоизомеры алифатических альдегидов с длиной цепи $C_{10}-C_{18}$. Так, ненасыщенные алифатические альдегиды (Z)-11-тетрадеценаль, (Z)-11-гексадеценаль, (Z)-9-гексадеценаль идентифицированы в качестве основных компонентов половых феромонов хлопковой (*Heliothis armigera*), озимой (*Scotia segetum*) совок, изомеры 6,11-гексадекадиенала — сибирского (*Dendrolimus sibiricum*) и китайского дубового (*Authegaea pernyi*) шелкопрядов.

Сравнительный биоломннесцентный анализ ненасыщенных алифатических альдегидов — половых феромонов насекомых

Альдегид-феромон	Интенсивность биоломннесценции I_{max} , %*	
	люцифераза	
	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Vibrio fischeri</i>
Додеканаль	4±1,0	11±2,0
(Z)-9-Додеценаль	1±1,0	3±2,0
Тетрадеканаль	100±6,0	100±4,0
(E, Z)-6,11-Тетрадекадиеналь	6±2,0	3±2,0
Гексадеканаль	15±1,0	19±3,0
(E)-9-Гексадеценаль	145±7,0	112±3,0
(Z)-9-Гексадеценаль	111±3,0	200±6,0
(E)-6-Гексадеценаль	61±7,0	32±2,0
(Z)-6-Гексадеценаль	254±5,0	187±13,0
(Z, E)-6,11-Гексадекадиеналь	107±6,0	71±7,0
(E, Z)-6,11-Гексадекадиеналь	100±5,0	68±6,0
(Z, Z)-6,11-Гексадекадиеналь	150±7,0	90±4,0
(Z, Z)-9,15-Линолевый альдегид	33±2,0	18±2,0
(Z, Z, Z)-9,11,15-Линолеповый альдегид	18±3,0	29±2,0

* Интенсивность биоломннесценции люцифераз с тетрадеканалем принята за 100%. Активности люцифераз с другими альдегидами представлены в процентном отношении к активности с тетрадеканалем. Концентрация люциферазы: 1,5 и 0,5 мкг/мл для *V. harveyi* и *V. fischeri* соответственно. Концентрация альдегидов 0,14 мкг/мл.

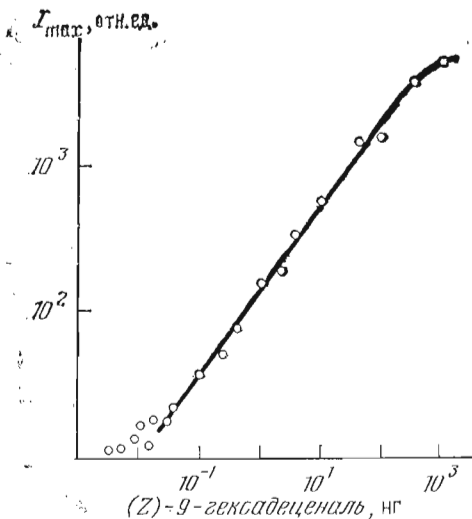


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость интенсивности биоломисценции (I_{\max}) люциферазы из *V. harveyi* от количества (Z)-9-гексадеценаля в пробе. Каждое значение I_{\max} (среднее из трех измерений) получено после вычитания фонового свечения на эндогенном альдегиде

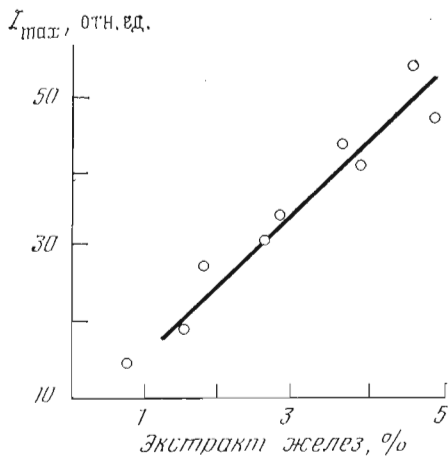


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость интенсивности биоломисценции I_{\max} люциферазы из *V. harveyi* от концентрации экстракта желез *A. pernyi*. Гексановый экстракт 20 самок припят за 100%. Каждое значение I_0 получено как среднее из четырех измерений

В настоящей работе исследовано взаимодействие с бактериальной люциферазой ненасыщенных алифатических альдегидов различной структуры, являющихся половыми феромонами хлопковой совки, дубового шелкопряда и некоторых других насекомых.

Структура альдегида определяет интенсивность и кинетику световой эмиссии реакции люциферазы. Представленная на рис. 1 динамика люминесценции получена с использованием (E, Z)-6,11-гексадекадиенала в качестве гидрофобного субстрата при восстановлении FMN дитионитом $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ и запуске реакции кислородом.

В скрининге ненасыщенных альдегидов-феромонов насекомых были использованы препараты ферментов из двух видов люминесцентных бактерий: *V. harveyi* и *V. fischeri*. Обнаружено, что на взаимодействие ненасыщенных альдегидов с люциферазой кроме длины цепи влияют число, положение и изомерия двойных связей.

В таблице представлены результаты биоломисцентного анализа ненасыщенных алифатических альдегидов различной структуры с длиной цепи C_{12} — C_{18} . Для сравнения приведены соответствующие данные для насыщенных альдегидов. У насыщенных альдегидов максимальная активность обеих люцифераз наблюдается с тетрадеканалем, в ряду ненасыщенных альдегидов наиболее активны альдегиды с 16 углеродными атомами. Средство обоих препаратов люцифераз к ненасыщенным C_{16} -альдегидам существенно выше, чем к гексадеканалу, в то время как активность с тетрадеканалем и додеканалем выше, чем с ненасыщенными альдегидами соответствующей длины цепи.

На примере моноеновых C_{16} -альдегидов видно, что *цис-транс*-переходы двойных связей наиболее сильно отражаются на активности обоих ферментов, когда двойная связь приближена к карбонильному остатку, причем *цис*-изомеры более активны, чем соответствующие *транс*-изомеры. Удаленность двойной связи от функциональной группы нивелирует различия в изомерии двойных связей. Ранее было показано [2, 7], что наличие двойных связей у конца цепи мало сказывается на эффективности реакции — полностью активны галогенсодержащий альдегид (11-бромундеканаль), сложнзамещенный альдегид вида $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_7\text{CHO}$, в то время как 2-деценаль неэффективен в биоломисцентной реакции [7]. Высокую

специфичность люциферазы в отношении химической структуры альдегида нельзя объяснить только изменением конформации высокоэнергизованного интермедиата фермента [2] или влиянием на один из лимитирующих этапов образования интермедиатов [10] и тем более реакцией субстрата с пероксифлавином. Такой важный параметр, как длина цепи, несущественно отражается на величине свободной энергии окисления альдегидов в карбоновую кислоту, которая составляет 76–80 кДж/моль для альдегидов с различным числом С-атомов [11].

Среди исследованных изомеров 6,11-гексадекадненаль наиболее активен *Z, Z*-изомер; *E, Z*- и *Z, E*-изомеры взаимодействуют с препаратами обеих люцифераз с одинаковой эффективностью. В ряду моноеновых C_{16} -альдегидов максимальной эффективностью в реакции с люциферазой из *V. harveyi* обладает *цис*-6-гексадеценаль, с люциферазой из *V. fischeri* — *цис*-9-гексадеценаль, наименее активен с обоими ферментами *транс*-6-гексадеценаль.

Кинетика затухания, хотя и в меньшей степени, чем интенсивность люминесценции, отражает структурные различия альдегидов (рис. 2). Для изомеров диеновых C_{14} - и C_{16} -альдегидов наиболее четкие различия в константах распада получены на препарате из *V. fischeri*: $0,21 \pm 0,015 \text{ с}^{-1}$ для (*Z, Z*)- C_{16} ; $0,08 \pm 0,005$ для (*E, Z*)- C_{16} и $0,048 \pm 0,005 \text{ с}^{-1}$ для (*E, Z*)- C_{14} . На препарате из *V. harveyi* константы для этих альдегидов различались существенно меньше и составили соответственно 0,035; 0,028; 0,020 с^{-1} . Несмотря на различное сродство люцифераз к альдегидам, для каждого фермента проявляется четкая закономерность между интенсивностью эмиссии и кинетической константой распада: чем выше скорость реакции, тем быстрее происходит распад комплекса.

Учитывая последние данные [6], из которых следует, что связывание альдегида и флавина на ферменте протекает независимо, причем альдегид связывается по гидрофобному механизму [12, 13] при участии всей длины алкильной цепи и с большим вкладом СНО-группы, можно допустить, что различия в субстратной специфичности ненасыщенных альдегидов определяются специфической структурой места связывания — гидрофобного «кармана» и решающее значение играет подвижность карбонильной группы в активном центре люциферазы.

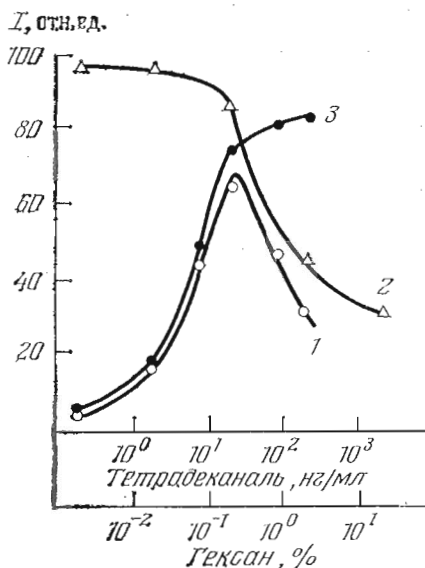
Результаты скрининга феромонов показали, что бактериальная люцифераза может использоваться в качестве аналитического датчика. Установлено, что зависимость интенсивности свечения от концентрации альдегида описывается степенной функцией для обоих препаратов. В двойных логарифмических координатах эта зависимость линейна в диапазоне 5 порядков с тангенсом угла наклона 0,35–0,45 для фермента из *V. harveyi* (рис. 3) и в диапазоне 4 порядков с тангенсом угла наклона 0,5–0,6 для препарата из *V. fischeri*.

Пороговая чувствительность к C_{16} -моноеновым и -диеновым альдегидам, обусловленная высоким квантовым выходом в сочетании с низким числом оборотов фермента, составляет 10 пг для люциферазы из *V. harveyi* и 100 пг для люциферазы из *V. fischeri*. Это играет существенную роль при использовании ферментов в анализе феромонов в воздухе, в экстрактах тела и желез насекомого. Аналитическое определение насыщенных альдегидов характеризуется пороговой чувствительностью к тетрадеканалу и деканалу 10 и 50 пг соответственно с линейностью в диапазоне 4 порядков концентраций.

На рис. 4 представлена зависимость интенсивности люминесценции люциферазы от концентрации экстракта желез дубового шелкопряда *A. pernyi* (концентрация исходного экстракта 20 самок в люминесцентной смеси принята за 100%). Высокая чувствительность метода позволяет ограничиться экстрактом желез одной самки. Параллельно проведенный контроль с использованием газовой хроматографии показал хорошую корреляцию с биолюминесцентным анализом: коэффициент корреляции 0,97.

Основное ограничение чувствительности биолюминесцентного метода — наличие эндогенного альдегида в препаратах люциферазы. Меньшая чувствительность препарата из *V. fischeri* обусловлена более высоким

Рис. 5. Зависимость интенсивности биолюминесценции люциферазы из *V. fischeri* (I_{\max}) от концентрации тетрадеканала в присутствии гексана (1); ингибирование активности фермента гексаном (2); скорректированная с учетом ингибиторного действия гексана концентрационная зависимость для взаимодействия фермента с тетрадеканалем (3). Условия определения: $2 \cdot 10^{-4}$ М NADH, люцифераза 1,5 мг/мл



(примерно в 7 раз) уровнем фонового свечения фермента с эндогенным альдегидом. Удаление эндогенного альдегида в реакции с гидросиламином, динитрофенилгидразином или «выжиганием» в циклической реакции может быть успешно использовано для повышения чувствительности к экзогенным альдегидам. Вместе с тем не исключено, что в основе разного уровня фоновой люминесценции на эндогенном альдегиде у люцифераз из различных видов бактерий заложено различие не в количестве, а в структуре так называемого альдегидного фактора.

Анализ алифатических альдегидов методом биолюминесценции отличается от обычно используемой процедуры определения кофакторов и метаболитов [2], где субпикомолярная чувствительность достигается при высоких (до 10 мг/мл) концентрациях люциферазы. С увеличением концентрации люциферазы пропорционально возрастает фоновое свечение, и для всех альдегидов пороговая чувствительность остается постоянной величиной. При концентрациях альдегида свыше 1 мкг/мл наблюдается отклонение от линейности. Зависимость скорости реакции, катализируемой люциферазой, от концентрации субстрата имеет вид кривой с резко выраженным максимумом (рис. 5, 1). Известно, что бактериальная люцифераза чрезвычайно чувствительна к гидрофобным соединениям различной химической природы [14]. Ингибирующие свойства обычно используемых в качестве неполярных растворителей гексана, гептана, хлороформу метилена были проверены на обоих ферментных препаратах. Обнаружено, что все эти соединения являются специфическими ингибиторами люциферазы (например, рис. 5, 2), причем ингибирование протекает строго по конкурентному типу. Введение поправочных коэффициентов, учитывающих влияние гексана при концентрациях выше 0,1% (по объему), дает типичную кривую Михаэлиса (рис. 5, 3) для взаимодействия всех альдегидов с люциферазой.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что биолюминесцентный метод детекции феромонов с использованием бактериальной люциферазы характеризуется рядом преимуществ по сравнению с традиционными методами анализа (например, ГЖХ): как минимум 1000-кратным преимуществом в чувствительности, быстродействием (время анализа пробы не более 1 мин), воспроизводимостью (ошибка не превышает 5%). Препараты люцифераз высокостабильны (при хранении при -20°C в растворе с 30% глицерином фермент теряет за год меньше 5% активности). Простая регистрирующая аппаратура, основанная на стандартных усилителях напряжения, в том числе на интегральных схемах, а также малогабаритных блоках питания фотоэлектромножителей, может быть использована как в лабораторном, так и в автономном полевом режиме.

Как аналитический феромонный датчик бактериальная люцифераза может найти широкое применение также в контроле за химическим синтезом феромонов, при анализе феромонов в воздухе, в биотестировании. Сходная аналитическая система успешно использована для определения феромонов альдегидной природы в экстрактах желез, тела, антенн насекомых [15], в исследованиях путей биосинтеза и деградации феромонов в железах *Choris toneura femiferana* и детекции феромонов в воздухе [16, 17].

Кроме альдегидов основными и минорными компонентами феромонов являются спирты и ацетаты. Превращение этих соединений в альдегиды можно осуществить энзиматическим путем с высокой эффективностью, и сопряжение со вспомогательными ферментами позволяет резко расширить границы аналитического применения биолюминесцентного метода.

Наряду с аналитическим применением бактериальная люцифераза может рассматриваться в качестве модели при исследовании механизмов сенсорной рецепции и первичных актов преобразования энергии.

Экспериментальная часть

Люциферазы были выделены из двух люминесцентных видов бактерий *V. harveyi* и *V. fischeri* по методике, описанной в работе [18]. Концентрированные растворы ферментов хранились при -20°C в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7, с 0,005 М дитиотреитом и 30 % глицерином.

Стереоизомеры альдегидов получены с выходом 70–85 % окислением пиридинийхлорхроматом в хлористом метиле соответствующих спиртов, синтезированных по схемам, описанным в работах [19, 20].

Структурные характеристики изомеров определялись с помощью газовой хроматографии. Содержание активной формы вещества не менее 95 %. Растворы альдегидов в гексане (1 мг/мл) хранились при -7°C . В опытах использовали водные растворы альдегидов, полученные последовательными разведениями исходного раствора сначала в этаноле (0,1 мг/мл), затем, начиная с концентрации 0,01 мг/мл, в H_2O . Сильно разбавленные водные растворы альдегидов сохраняли стабильность в течение 1 ч.

Насыщенные алифатические альдегиды получены от фирмы Fluka (Швейцария). Люминесцентная смесь содержала 0,1 М К,Na-фосфатный буфер (pH 7); $2 \cdot 10^{-5}$ М FMN, бактериальную люциферазу с конечной концентрацией по белку $1,5 \cdot 10^{-3}$ мг/мл (*V. harveyi*) и $5 \cdot 10^{-4}$ мг/мл (*V. fischeri*), общий объем 500 мкл. Анализируемый раствор альдегида (10 мкл) добавляли к люминесцентной смеси, реакцию инициировали введением дитионита натрия (0,5 мг/мл) с интенсивным перемешиванием. Подробно методика анализа активности люциферазы с использованием дитионита натрия описана в работе [21].

Интенсивность люминесценции регистрировали на установке, включающей в себя термостатированную камеру с перемешиванием, фотоумножитель, калиброванный по стандарту, микровольтметр с самописцем и блок питания ФЭУ. Анализ каждой пробы проводили 3–4 раза, ошибка метода не превышала 5%. В качестве аналитического теста использовали величину максимальной интенсивности свечения, которую выражали в относительных единицах. 1 отн. ед. соответствует $2,2 \cdot 10^7$ квант \cdot с $^{-1}$. Количественную оценку проводили после вычисления фонового свечения люциферазы.

Содержание феромонов в железах анализировали после предварительной процедуры экстракции гексаном (200 мкл), выпаривания растворителя под вакуумом и переосаждения осадка в водном растворе. Независимо количественную оценку феромонов проводили на газовом хроматографе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rogers P., McElroy W. D. Arch. Biochem. and Biophys., 1958, v. 75, № 1, p. 87–105, 106–116.
2. Hastings J. W., Gibson Q. H., Friedland J., Spudich J. A. In: Bioluminescence in progress/Eds Johnson F. H., Haneda Y. N. Y.: Acad. Press, 1966, p. 151–186.
3. Hastings J. W., Spudich J. A., Malnic G. J. Biol. Chem., 1963, v. 238, p. 3100–3105.
4. Lee J., Murphy C. L. In: Chemiluminescence and bioluminescence/Eds Cormier M. J., Hercules D. M., Lee J. N. Y.: Plenum Press, 1973, p. 381–386.

5. *Watanabe T., Nakamura T.* J. Biochem., 1972, v. 72, № 3, p. 647-653.
6. *Holzman T. F., Baldwin T. O.* Biochemistry, 1983, v. 22, № 12, p. 2838-2846.
7. *Spudich J. A., Hastings J. W.* J. Biol. Chem., 1963, v. 238, p. 3106-3108.
8. *Meighen E. A., Slessor K. N., Grant G. G.* Experientia, 1981, v. 37, p. 555-557.
9. *Meighen E. A., Slessor K. N., Grant G. G.* J. Chem. Ecol., 1982, v. 8, № 6, p. 911-921.
10. *Presswood R. P., Shannon P., Spencer R., Walsh C., Vecvar J. E., Tu S.-C., Hastings J. W.* In: Flavins and flavoproteins/Eds Kunio Y., Toshio Y. Tokyo - Baltimore: Japan Sci. Soc. Press; Univ. Park. Press, p. 155-160.
11. *Vecvar J. E., Wu L.-H.* In: Bioluminescence and chemiluminescence/Eds DeLuca M., McElroy W. D. N. Y.: Acad. Press, 1981, p. 147-153.
12. *Данилов В. С., Исмаилов А. Д., Малков Ю. А., Егоров Н. С.* Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 1, с. 68-74.
13. *Viswanathan T. S., Campling M. R., Cushley R. J.* Biochemistry, 1979, v. 18, № 12, p. 2504-2508.
14. *Исмаилов А. Д., Баранова Н. А., Данилов В. С., Егоров Н. С.* Биохимия, 1981, т. 46, № 2, с. 234-239.
15. *Grant G. G., Slessor K. N., Szittner R. B., Morse D., Meighen E. A.* J. Chem. Ecol., 1982, v. 8, № 6, p. 935-945.
16. *Szittner R. B., Morse D., Grant G. G., Meighen E. A.* J. Chem. Ecol., 1982, v. 8, № 6, p. 935-945.
17. *Morse D., Meighen E. A.* J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 1, p. 475-480.
18. *Шумихин В. Н., Данилов В. С., Егоров Н. С.* Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 765-772.
19. *Ковалев Б. Г., Рассветгаева В. М., Юдин Л. Г., Бундель Ю. Г.* Журн. орган. химии, 1983, т. 7, с. 1542-1543.
20. *Kochansky J., Terz E. F., Tashenberg R. T., Carde A., Kaissling K. E., Roelofs W. L.* J. Insect Physiol., 1975, v. 21, p. 1977-1983.
21. *Шумихин В. Н., Данилов В. С., Егоров Н. С.* Биофизика, 1981, т. 6, № 1, с. 130-132.

Поступила в редакцию
12.V.1985
После доработки
1.VIII.1985

BACTERIAL LUCIFERASE AS A BIOSENSOR OF PHEROMONES OF INSECTS

ISMAILOV A. D., KOVALJEV B. G.*, SACHAROV G. N.,
STRELSKY V. V., DANILOV V. S., YEGOROV N. S.

*M. V. Lomonosov Moscow State University; * Research Institute
for Biological Methods of Plant Protection, Kishinev*

Peculiar features of bacterial luciferase as a biosensor of pheromones of insects have been studied. Various stereoisomers of unsaturated aliphatic C₁₀-C₁₈ aldehydes of both major and minor components of sex pheromones of *Heliotis armigera* and *Atheraea pernyi* were analyzed. Luciferase preparations from luminescent bacteria *V. harveyi* and *V. fischeri* were found to differ in their affinity to the aldehyde isomers. The emission intensity and dissociation kinetics are affected by structural parameters of the aldehyde-pheromones, i. e. by the chain length, number, position and isomerism of the double bonds. The analytical system was successfully used for determination of both synthetic and natural pheromones, the range of sensitivity being 10 pg of C₁₆-aldehyde. Luciferase was found to exhibit different specificity for saturated and unsaturated aldehydes. The role of interaction between aldehydes and bacterial luciferase is discussed.